

諸言

鉄は、生命維持に欠かせないミネラルとしてきわめて微量ながら生体内の代謝を円滑にするために必要不可欠である。しかし、現在世界では食糧不足や過剰なダイエットによる貧血が社会問題となっており、発展途上国だけでなく先進国においても多くの女性に影響を及ぼしている。このような背景から、鉄欠乏が原因で生じる鉄欠乏性貧血は世界で最も深刻な栄養不足問題の一つとされており、日本においても例外ではない。

世界では鉄欠乏性貧血の対応策が取られており、食品への鉄添加によって若い女性の貧血の頻度が減少してきていることが報告されている (Zimmermann *et al.*, 2007)。一方で、ビタミンやミネラルのサプリメントの長期摂取による死亡リスクの増加に鉄が強く影響していることが示された (Mursu *et al.*, 2011)。そのため、鉄は欠乏しやすく必要十分量を摂取する必要があるが、鉄サプリメントなどの濫用により、生体内鉄量が過剰になりやすい傾向が有ると言える。

食品に含まれる鉄はヘム鉄と非ヘム鉄に大きく分けられ、その吸収性はヘム鉄の方が優れており、食事由来成分からの影響を受けにくいとされてきた (Layrisse *et al.*, 1973; Björn *et al.*, 1974)。しかし、近年、これらの結果とは異なり、非ヘム鉄の方がヘム鉄と比較して吸収性に優れているとされる結果が報告されている (村上ら, 1997; 五十嵐ら, 2004)。また、Caco-2細胞やラットの十二指腸を用いた実験から共存物質がヘム鉄の吸収に及ぼす影響も報告されており、特定のタンパク質・ペプチド・アミノ酸によるヘム鉄の取り込み促進効果が示唆された (Vaghefi *et al.*, 1998; Vaghefi *et al.*, 2005; Villarro *et al.*, 2011)。しかし、これらの現象が実際に生体内で起きる

のかは明らかとされていない。

本研究室の篠田は、鉄欠乏ラットに非ヘム鉄である FeSO_4 及び限外濾過により精製された水溶性ヘム鉄 (MW : 約 5.58 kDa) を十二指腸に投与して血清鉄濃度を調べた結果、水溶性ヘム鉄投与群では FeSO_4 投与群と比較して有意に低くなることを明らかにした (篠田, 2012)。上記の研究では、塩酸で溶解した水溶性ヘム鉄を直接十二指腸に投与しており、胃で起こる消化の過程を再現できていない。そのため、胃で消化により水溶性ヘム鉄に結合するグロビンが分解され、分解生成物やそれによる可溶性の変化が十二指腸からのヘム鉄の取り込みや輸送に影響を及ぼす可能性が考えられる。

そこで、本研究では消化管における消化がヘム鉄の取り込みや輸送に影響を与えるか否か明らかにする。

1. 背景

1-1. 世界と日本の鉄栄養状態

鉄は、生命維持に欠かせない五大栄養素（タンパク質・脂質・炭水化物・ビタミン・ミネラル）の中のミネラルに分類され、生体内で様々な生理作用を有している。主にヘモグロビン、ミオグロビンの構成成分として酸素の運搬を担う役割（樋口, 1995）やカタラーゼ、ペルオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなどの構成成分として酸化・還元反応を触媒する機能（山根, 1990）が挙げられ、きわめて微量ながら生体内の代謝を円滑にするために必要不可欠である。

現在、世界では全人口の 24.8%に当たる推定 16.2 億人が貧血であり（WHO, 2014）、食事由来の鉄不足が関係しているとされている。貧血の定義は世界保健機関（WHO）が定めた血液 100ml 当たりのヘモグロビン（Hb）基準量より減少した状態とされており、小児および妊婦では 11g 未満、思春期および成人女性では 12g 未満、そして、成人男性では 13g 未満である（WHO, 1968）。鉄欠乏性貧血の有病率は年齢・性別・人種によって異なるが特に女性に多く見られ、先進国では人口の約 4.3～20%、発展途上国では人口の約 30～48%に上がることが報告されている（De *et al.*, 2014; CDC, 2002）。日本においても例外ではなく、男性では 1%未満であるのに対して女性では 20%にものぼり、日本人女性の貧血の頻度は増加の一途をたどっている（小阪, 2012）。特に若年女性の頻度が高く、今後も継続的な調査が必要である（Hayashi *et al.*, 2007）。これらの原因として、近年では妊娠や月経による鉄の喪失以外にもやせ願望の強い女性の過った偏食による栄養素摂取の不均衡が引き起こす影響が問題となっており、痩せている者は太

りぎみの者と比較して約 2 倍も貧血状態であることが報告されている (金沢と岩崎, 1991)。

鉄は体内では生成されないため、日頃の食生活から鉄含有食品の摂取を増やすことで鉄摂取不足を改善する必要がある。世界では鉄欠乏性貧血の対応策が取られており、米国では小麦粉への鉄添加の開始によって、若い女性の貧血の頻度が減少してきていることが報告されている (Zimmermann *et al.*, 2007)。

一方で、平均年齢 61.6 歳の米国女性を対象とした Iowa Women's Health Study において、一般的に使用されているビタミンやミネラルのサプリメントの長期摂取が死亡リスクの増加と関係していることが報告されており、特に鉄の影響が強いことが示された (Mursu *et al.*, 2011)。また、近年では疫学・病理学的な研究において、鉄の過剰摂取による臓器への鉄蓄積が癌などの慢性疾患の発症リスクを高めることも明らかとなっている (Ko *et al.*, 2007)。

このように、鉄は欠乏しやすいため必要十分量を摂取する必要があるが、それと同時に、鉄サプリメントなどの濫用により生体内鉄量が過剰になりやすい傾向もある。

1-2. 共存物質が非ヘム鉄の吸収に及ぼす影響

食品中の鉄にはヘム鉄と非ヘム鉄が存在する。ヘム鉄は血色素タンパク質であるヘモグロビンや筋肉色素であるミオグロビンの構成成分であり、獣鳥肉類や海を遊泳するカツオ、マグロ、サンマ、アジ、イワシ、サバなどの魚介類の赤身に豊富に含まれている。非ヘム鉄は主に大豆、野菜、海藻類、穀類などの植物性食品に含まれており、貝類などの一部の動物性食

品にも含まれている (古俣, 2006)。

1-1 において食品による鉄欠乏症対策が実施されていると述べたが、非ヘム鉄とヘム鉄では吸収率が大きく異なり、ヒトを対象とした実験で、非ヘム鉄は 5% 以下、ヘム鉄では 37% であるとされており (Björn *et al.*, 1974)、ヘム鉄の方が非ヘム鉄より吸収率が高いと報告されている (Layrisse *et al.*, 1973)。要因として、非ヘム鉄は腸管内で鉄イオンとして存在しているため、同時に摂取する食事由来成分からの影響を受けやすい可能性がある。一方、ヘム鉄の鉄は小腸管腔内では遊離せず、小腸粘膜細胞内で Heme oxygenase 1 (HO-1) によって開裂した後に鉄イオンとなる。そのため、ヘム鉄はこれらの影響を受けにくいと考えられている (Layrisse *et al.*, 1973)。このように鉄の形態と共存物質の存在は鉄吸収に及ぼす影響を考える上で重要な要素であるが、それには促進と抑制の両方が存在する。

非ヘム鉄吸収を促進させる成分の例として、ビタミン C が挙げられる。その効果は不溶性である 3 価鉄を可溶性の 2 価鉄へ還元したり、3 価鉄と結合して錯体を形成することで可溶性を高め、吸収を促進する。また、クエン酸もビタミン C と同様に錯体形成により鉄吸収を促進するが、クエン酸に対して鉄が過剰に存在する場合は錯体が不溶化するため、逆に吸収を阻害することも報告されている (古俣, 2006)。さらに、近年では貧血のベトナム人女性を対象とした鉄欠乏性貧血の改善を検討した実験において、難消化性二糖である Difructose anhydride III (DFAIII) が非ヘム鉄の FeSO_4 の吸収促進をすることが明らかとなった (Nakamori *et al.*, 2010)。

一方、非ヘム鉄吸収を阻害する成分の例として、タンニン、フィチン酸、食物繊維が挙げられる。いずれも鉄と結合して不溶化することで鉄の吸収を阻害し、タンニンにおいては pH の高い条件で鉄との結合が強くなるこ

とが報告されている (渡辺, 1968) 。また、コーヒーに含まれる成分にも鉄結合能を有するものが存在するが同定はされていない (関口, 1992) 。

1-3. 共存物質がヘム鉄の吸収に及ぼす影響

1-2. より、ヘム鉄は鉄吸収において共存物質による影響は受けにくいと述べたが、近年、これまでとは逆に、非ヘム鉄の方がヘム鉄と比較して吸収性に優れているとされる結果も報告され (村上ら, 1997; 五十嵐ら, 2004) 、当研究室においても鉄欠乏ラットを用いた実験により、非ヘム鉄の吸収率は 50.7~ 76.1%にも上がることが明らかとなっている (Shinoda *et al.*, 2014) 。また、共存物質がヘム鉄の吸収に及ぼす様々な影響も報告されている。

Caco-2 細胞の鉄取り込みにおけるアルブミンの影響を検討した先行研究において、ヘム鉄がペプシンやパンクレアチンによる消化を受けても鉄の取り込みには影響を受けないが、アルブミンの添加で顕著に低下し、特定のタンパク質やペプチドが鉄の取り込みの促進に関与することが示された (Villarro *et al.*, 2011) 。一方、ウッシングチャンバーを用いてラット十二指腸における鉄取り込み率を調べた実験において、ペプシンによる消化を受けたヘモグロビンの鉄の可溶性は増加し、さらに豆からの鉄吸収を促進するとされているアミノ酸のシステイン (Vaghefi *et al.*, 1998) を加えることで、鉄の取り込みを有意に高めることが明らかとなった (Vaghefi *et al.*, 2005) 。

このように、ヘム鉄の取り込みにおいても腸管腔内の因子が調節している可能性が考えられる。一般的にサプリメントとして用いられている水溶性ヘム鉄は自身に結合するグロビンタンパク質を有しており、胃の消化酵

素であるペプシンによって分解される。しかし、この分解で生じる生成物が生体内において鉄の取り込み・輸送に及ぼす影響は明らかとなっていない。

1-4. 消化管からの鉄吸収メカニズム (図 1)

ヘム鉄と非ヘム鉄の吸収は主に腸管上皮から行われ、粘膜細胞内に取り込まれる過程と、粘膜細胞から血液へと輸送される過程の 2 段階に分けられる。

ヘム鉄の取り込みは腸粘膜細胞表面から行われるが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。近年では 2005 年にヘム鉄輸送態として Heme-carrier protein 1 (HCP1) が発見されており、十二指腸で mRNA 発現が見られ、回腸では見られないことが報告されている (Shayeghi *et al.*, 2005)。一方、本研究室の東によると、回腸でも HCP1 の mRNA 発現が見られ、鉄欠乏ラットにおいて小腸上部から中部にかけて HCP1 の mRNA 発現が高いことが明らかとなっている (東, 2016)。しかし、HCP1 は葉酸の輸送体としての機能も持ち (Inoue *et al.*, 2008)、ヘムよりも葉酸に対する親和性が高いことから、ヘムの主要な輸送体でない可能性が指摘されている (Laftah *et al.*, 2009)。取り込まれたヘム鉄は HO-1 による分解を経て鉄を遊離し、鉄は Ferritin に貯蔵されるか、ferroportin 1 (FPN1) によって血液に輸送される。また、近年、ヘムを輸送することが知られている Feline leukemia virus subgroup C receptor (FLVCR) の mRNA とタンパク質発現がヒト大腸癌細胞の Caco-2 細胞で特に高いことが明らかとなり、HO-1 による分解を受けずに FLVCR によって、腸粘膜細胞の基底膜側から血液へと輸送する経路が存在する可能性が示唆された (Quigley *et al.*, 2004)。

一方、非ヘム鉄の取り込みは、十二指腸粘膜細胞表面の 3 価鉄還元酵素である Duodenal cytochrome b (Dcytb) によって 2 価鉄に還元された後、2 価金属トランスポーターである Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) を介して行われる (Gunshin *et al.*, 1997)。取り込まれた非ヘム鉄は HO-1 による分解を受けたヘム鉄と同様に、Ferritin に貯蔵されるか、FPN1 によって 2 価鉄の形態で血液へ輸送される。

このような過程を経て血中に輸送された 2 価鉄は Hephaestin と呼ばれる含銅鉄酸化酵素により 3 価鉄へと酸化され、Apo-Transferrin と結合することで Transferrin 鉄として骨髄や貯蔵臓器に輸送される (宇野ら, 2009; 小林ら, 2007)。

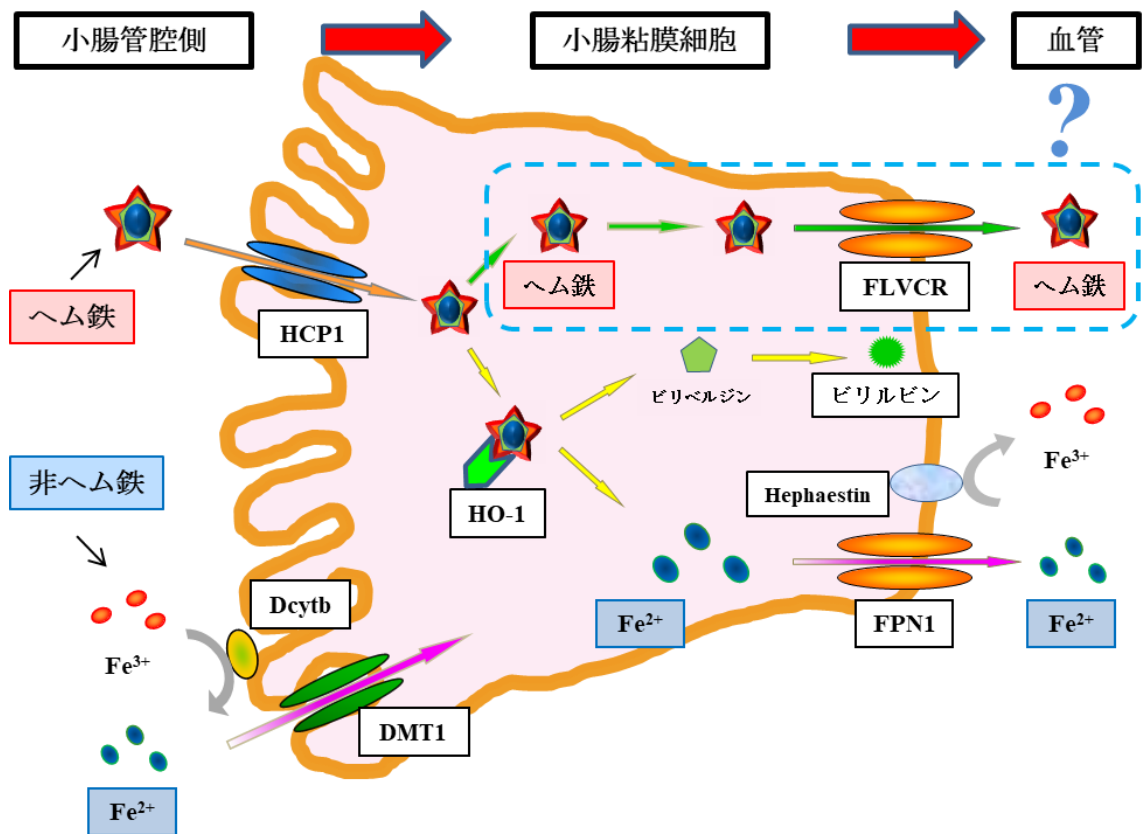


図 1. 小腸粘膜における鉄吸収メカニズム

2. 研究の目的

食品中に含まれる鉄には動物性食品に含まれる「ヘム鉄」と植物性食品に多く含まれる「非ヘム鉄」が存在し、ヒトを対象とした実験において吸収率は前者で 37%、後者で 5%以下であり、ヘム鉄の方が吸収性に優れている (Björn *et al.*, 1974) 。この吸収率の違いには、鉄が取り込まれる腸管内での鉄自体の形態が関係しており、また、ヘム鉄は非ヘム鉄と比べて吸収阻害物質による影響を受けにくいことも吸収率が高い要因の 1 つとして挙げられる。

また近年では、共存物質がヘム鉄の吸収に及ぼす様々な影響が報告されている。培養細胞における鉄の取り込みが特定のタンパク質やペプチドによって促進されること (Villarro *et al.*, 2011) 、人工消化を受けたヘム鉄の取り込みがアミノ酸の存在下で高まることなどが示唆されている。しかし、これらの現象を *in vivo* で検証した報告はない。

本研究室の先行研究において、鉄欠乏ラットに非ヘム鉄 (FeSO_4) 及び水溶性ヘム鉄 (MW : 約 5.58 kDa) を投与した群の鉄取り込み量には有意差が見られなかった。また、門脈血の血清鉄濃度は、水溶性ヘム鉄投与群で FeSO_4 投与群と比較して有意に低くなった (篠田, 2012) 。胃や小腸では、タンパク質が消化酵素によってポリペプチド、オリゴペプチド、そしてアミノ酸へと分解される。しかし、この実験ではヘム鉄の 10mM 塩酸溶液を十二指腸に投与したため、グロビンの消化が不十分であり、そのことがヘム鉄の取り込みに影響したと考えられる。

そこで、本研究において、消化酵素により分解された水溶性ヘム鉄は、十二指腸での取り込み、輸送が増加するという仮説を立てた。この仮説を

立証するために、実験 1 ではペプシンで人工消化した水溶性ヘム鉄、水溶性ヘム鉄及びヘミンを鉄欠乏ラットの十二指腸に投与することで、グロビンの分解生成物が十二指腸管腔から粘膜細胞への鉄の取り込みや粘膜細胞から門脈血への鉄の輸送に及ぼす影響を検討した。また、ヘム鉄の酵素分解によって生成するペプチドやアミノ酸はヘム鉄の重合や不溶化を防ぐとされる。実験 2 ではペプシン・パンクレアチン消化による分解生成物の増加や消化管内での pH 変動が水溶性ヘム鉄の溶解性に影響を及ぼすか否かを検討した。

3. 実験 1：ペプシン消化が十二指腸におけるヘム鉄の

取り込み・輸送に及ぼす影響

3-1. ペプシン消化によるヘム鉄の分解率

水溶性ヘム鉄（MW：約 5.58 kDa；ILS，東京） 174.4 mg を 300mM HCl 2.5 mL で 1 日攪拌した。溶解後、1.5 M NaCl 2.5 mL を加え超純水で 25 mL にメスアップし、2.0 mL ずつ試験管に分取した。分取した溶液に Simulated Gastric Buffer (SGB；0.3 M NaCl、50 mM HCl 含有) 0.25mL を加え 37℃、10 分間インキュベートした後に、予め 10 mM HCl で溶解したペプシン溶液 (36.96 mg/mL) 0.25 mL を加え 37℃で人工消化を行った。また、人工消化を行わないサンプルはペプシンの代わりに 10 mM HCl を 0.25 mL 加えた。0.5、1.0、1.5、2.0 時間後、HEPES buffer (pH 7.2) を 700 μL 加えて pH 6.8 とし、さらに氷冷することで反応を停止させた。

これらの試料を電気泳動ゲル (Peptide-PAGE mini 16 %、テフコ株式会社) に分取し、100 V、90 分間電気泳動を行った。泳動を行ったゲルは CBB 染色液で染色し、乾燥後に画像データとしてスキャナーでパソコンに読み取った。各試料の分解率は画像分析ソフトである ImageJ を用いて、水溶性ヘム鉄のバンド濃度を面積値として定量化し、以下の式を用いて算出した。

$$\text{分解率 (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100 (\%)$$

A：ペプシン消化を行わなかった水溶性ヘム鉄の面積値

B：ペプシン消化を行った水溶性ヘム鉄の面積値

3-2. 動物実験及び試料

投与試料

- 10 mM NaOH 溶液

50 mM NaOH 2.0 mL に 100 mM HCl 600 μ L を加え、超純水で 10 mL にメスアップした。

- 30 mM HCl 溶液

SGB 2.5 mL に 10 mM HCl 2.5 mL を加えて調製した。

- 1.0 mM ヘミン溶液

ヘミン (MW : 651.94 Da ; ILS, 東京) 約 16.30 mg に 50 mM NaOH 5.0 mL を加え 30 min 攪拌後、100 mM HCl 1.5 mL を加え、超純水で 25 mL にメスアップした。

- 1.0 mM 水溶性ヘム鉄溶液

水溶性ヘム鉄 (MW : 約 5.58 kDa ; ILS, 東京) 174.4 mg に 300 mM HCl 2.5 mL を加え 1 日攪拌した。溶解後、1.5 M NaCl 2.5 mL を加えて超純水で 25 mL にメスアップし、1.6 mL ずつエッペンドルフチューブに分取した。分取した溶液に SGB 0.2 mL を加え 37°C、10 分間インキュベートした後に 10 mM HCl 0.2 mL を加えた。

- 1.0 mM 人工消化水溶性ヘム鉄溶液

水溶性ヘム鉄 (MW : 約 5.58 kDa ; ILS, 東京) 174.4 mg に 300 mM

HCl 2.5 mL を加え 1 日攪拌した。溶解後、1.5 M NaCl 2.5 mL を加えて超純水で 25 mL にメスアップし、1.6 mL ずつエッペンドルフチューブに分取した。分取した溶液に SGB 0.2 mL を加え 37°C、10 分間インキュベートした後に、予め 10 mM HCl で溶解したペプシン溶液 (36.96 mg/mL) 0.2 mL を加えた。(※酵素反応は 1.5 時間行い、結紮したラット十二指腸への投与により、ペプシンの反応を停止した。)

実験操作

4 週齢の Wistar 系雄ラット (日本クレア社、東京都) の飼育は個別ケージを用いて、12 時間明暗サイクルの飼育室で行った。飲料水は脱イオン水を、飼料は表 1, 2 に示した鉄欠乏食 (AIN-93G, Iron deficiency) を 3 週間与えることで鉄欠乏ラット (FeD) を作成し、試験日前日に鉄無投与群として、10mM NaOH 投与群 (CN 群: n=3) 、30 mM HCl 投与群 (CH 群: n=3) 、鉄投与群として、ヘミン投与群 (N 群: n=7) 、水溶性ヘム鉄投与群 (H 群: n=7) 、人工消化水溶性ヘム鉄投与群 (DH 群: n=7) の 5 群に分けた。試験日に 3 種混合麻酔を腹腔内投与後、開腹し、十二指腸 (胃の幽門部直下とトライツ靱帯の間) を結紮し、内部に各試料 (10 mM NaOH 溶液、30 mM HCl 溶液、1.0 mM ヘミン溶液、1.0 mM 水溶性ヘム鉄溶液、1.0mM 人工消化水溶性ヘム鉄溶液) を 1.0ml 投与した。試料投与 15 分後に門脈及び下行大動脈から採血をした。血中ヘモグロビン濃度 (Hb) 、ヘマトクリット値 (Ht) 、ヘム鉄濃度、ビリルビン濃度、そして、血清鉄濃度 (SI 値) と UIBC 値の総和から総鉄結合能 (TIBC)・Transferrin (Tf) 飽和度を算出することで、鉄投与が血中に及ぼす影響を調べた。結紮をした十二指腸は摘出後に 0.9 %生理食塩水で外部の血液を洗浄し、内容物を 5.0 mL エッペンド

ルフチューブに、十二指腸粘膜細胞を 1.5 mL エッペンドルフチューブに採取した。

3-3. 生体試料の分析方法

3-3-1. 投与液中のヘム鉄濃度

投与液中の鉄濃度は原子吸光光度計 (SHIMAZU、AA-7000、京都府) を用いたグラファイトファーネス原子吸光法にて測定した。

鉄標準液を 0、10、20、30、40 ppb となるように調製し、試料量を 20 μ L として検量線を作成した。3-2 で作製した投与溶液は 2000～2500 倍希釈して測定し、検量線より投与液中に含まれる鉄濃度を算出した。

3-3-2. 十二指腸からの鉄取り込み率

(1) 十二指腸内容物中の残存鉄量の測定

回収した十二指腸内容物中の残存鉄濃度はグラファイトファーネス原子吸光法を用いて、原子吸光光度計 (SHIMAZU、AA-7000、京都府) で測定した。十二指腸内容物は 2000～2500 倍希釈して測定し、3-3-1 で作成した検量線より十二指腸内容物中の残存鉄濃度を算出した。

(2) 鉄取り込み率の測定

十二指腸からの鉄取り込み率は、投与液中の鉄量に対する投与液中と内容物中の鉄量の差の割合として示した。

3-3-3. 血液化学的分析

(1) ヘマトクリット (Ht) 値の測定

下行大動脈から採血した動脈血の一部をヘパリン処理されたヘマトクリット毛細管に採取した後、12,000 rpm、5 分間遠心分離を行った。生じた赤血球の沈殿を Ht 値として測定した。

(2) SI 値、UIBC 値、TIBC 値の測定

門脈血及び動脈血中の SI 値、UIBC 値、TIBC 値は 2-ニトロソ-5- (N-プロピル-N-スルホプロピルアミノ) -フェノール (Nitroso-PSAP) 法に基づくクイックオートネオ Fe (シノテスト株式会社、東京都) とクイックオートネオ UIBC (シノテスト株式会社、東京都) を使用し、同社の自動分析機 (日立 7180 型、HITACHI、東京都) を用いて測定した。

血清は門脈及び下行大動脈より採血した試料を 3,000 rpm、15 分間遠心分離することで得た。

SI 値の測定は鉄標準液を 0、40、80、120、160、200 $\mu\text{g}/\text{dL}$ となるように調製し、これらを各 15 μL ずつ測定に使用し、検量線を作成した。遠心分離によって得た血清試料も各 15 μL ずつ測定に使用し、検量線より門脈血及び動脈血中の SI 値を算出した。 (吸光度 750 nm)

UIBC 値の測定は鉄標準液を 0、100、200 $\mu\text{g}/\text{dL}$ となるように調製し、これらを各 10 μL ずつ測定に使用し、検量線を作成した。遠心分離によって得た血清試料も同様に各 10 μL ずつ測定に使用し、検量線より門脈血及び動脈血中の UIBC 値を算出した。 (波長 750 nm)

また、TIBC 値は各血清試料の SI 値と UIBC 値の総和とした。

(3) 血中ヘモグロビン濃度の測定

下行大動脈から採血した動脈血中のヘモグロビン濃度は SLS-ヘモグロビン法を原理とするヘモグロビン B-テストワコー (和光純薬工業株式会社、大阪) を用いて測定した。

ヘモグロビン標準液を 0、5、10、15、30 g/dL となるように調製した後、これらを各 10 μ L (30 g/dL は 20 μ L) ずつ測定に使用し、検量線を作成した。下行大動脈より採血した試料は 10 μ L ずつ測定に使用し、検量線より動脈血中のヘモグロビン濃度を算出した。(波長 540 nm)

(4) 血中ヘム鉄濃度の測定

門脈血及び動脈血中のヘム鉄濃度はアルカリ溶液法を原理とする QuantiChrom™ Heme Assay Kit (BioAssay Systems, USA) を用いて測定した。

血清は採取した血液試料を 3,000rpm、15 分間遠心分離することで得た。分離後、これらを 40 μ L ずつ測定に使用し、ヘム鉄標準液から作成した検量線より血中ヘム鉄濃度を算出した。(波長 400 nm)

(5) 血中ビリルビン濃度の測定

血中ビリルビン濃度は QuantiChrom Bilirubin Assay Kit (BAS, California) を用いて測定した。

検量線はビリルビン標準液 50 μ L に超純水を 200 μ L 添加することで調整した。3-3-3(2)で得られた血清を 50 μ L 使用し、Total Reagent を 200 μ L 添加した。10 秒間、プレートの攪拌を行った後に、室温で 10 分間インキュベートした。吸光度測定は Microplate Spectrophotometer (DYNEX TECHNOLOGIES, Spectra MR) を用いて行い、標準液の値から各サンプル

の血中ビリルビン濃度を算出した。(波長 530 nm)

3-3-4. HO-1 タンパク質の定量

(1) タンパク質の抽出

-80℃で凍結保存した小腸粘膜上皮細胞約 20 mg に RIPA buffer* 500 μ L と Protease inhibitor mix (GE ヘルスケアジャパン, 東京) を 1/100 量加え、バイオマッシャー (nippi, 東京) を用いてホモジナイズした。得られたホモジネート溶液を 24,652 \times g、4℃で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。

* RIPA buffer (Thermo, 東京) 組成 : 25 mM Tris-HCl pH7.6、150 mM NaCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、0.1% SDS

(2) タンパク質濃度測定 (BCA Protein Assay, Pierce)

タンパク質の定量は BCA 法 (O.D.540 nm における吸光度の測定) を原理とする BCA protein assay kit (サーモサイエンティフィック株式会社、神奈川) を用いた。検量線は 2000 μ g/mL のアルブミン溶液を超純水で 0、25、125、250、500、750、1000、1500、2000 μ g/ml に希釈することで調整した。

BCA Working Reagent (WR) は BCA Reagent A と BCA Reagent B を 50 : 1 で混合することで調製した。抽出したサンプル 20 μ L を採取し、WR を 160 μ L 添加した。30 秒間の攪拌後、37℃で 30 分間インキュベートしプレートを室温に戻してから Microplate Spectrophotometer (DYNEX TECHNOLOGIES, Spectra MR) を用いて吸光度を測定した。(波長 562 nm)

(3) HO-1 タンパク質の定量 (ELISA 法)

HO-1 タンパク質量は HO-1 (rat), ELISA kit (ENZO Life Sciences, ニューヨーク) を用いて測定した。検量線は、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の HO-1 検量線溶液を Sample Diluent で 0、0.195、0.39、0.78、1.56、3.125、6.25、12.5 ng/mL に希釈することで調整した。また、3-3-4 (1) で抽出したサンプルは Sample Diluent で 10 倍希釈した。マイクロプレートに HO-1 検量線溶液と希釈したサンプルを 100 μL 添加し、室温で 1 時間インキュベートした。液体を取り除き、洗浄操作 (1 \times Wash Buffer を 300 μL 添加し、取り除く) を 4 回繰り返した後に、Rat HO-1 Antibody を 100 μL 添加し、室温で 1 時間インキュベートした。先程と同様の洗浄操作を 4 回行った後、Rat HO-1 Conjugate を 100 μL 添加し、室温で 30 分間インキュベートした。再び洗浄操作を 4 回行った後、TMB Substrate を 100 μL 添加し、室温、暗室で 15 分間インキュベートした。Stop Solution 2 を 100 μL 添加し、10 分後に Microplate Spectrophotometer (DYNEX TECHNOLOGIES, Spectra MR) を用いて吸光度を測定した。(波長 450 nm)

3-4. 統計方法

統計分析は、エクセル統計 2012 (株式会社情報サービス) を用いて、投与液の違いによる影響を 1way ANOVA 及び Bonferroni の最小有意差法によって解析した。p 値が 0.05 未満の確率値を有意なものとした。

表1. 飼料組成

Ingredient	AIN-93G
	(Iron deficiency)
	g/kg diet
コーンスターチ	397.486
ミルクカゼイン	200.000
α 化コーンスターチ	132.000
グラニュー糖	100.000
精製大豆油	70.000
セルロースパウダー	50.000
ミネラルミックス (鉄除去)	35.000
ビタミンミックス (AIN-93VX)	10.000
L-シスチン	3.000
重酒石酸コリン	2.500
第3ブチルヒドロキノン	0.014

表2. ミネラルミックス組成

Ingredient	Iron deficiency
	g/kg mix
CaCO_3	357.00000
KH_2PO_4	196.00000
$\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	70.78000
NaCl	74.00000
K_2SO_4	46.60000
MgO	24.00000
$\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	6.06000
$2\text{ZnCO}_3 \cdot 3\text{Zn}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.65000
$\text{MnCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0.63000
$\text{CuCO}_3\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.30000
KIO_3	0.01000
Na_2SeO_4	0.01025
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.00795
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1.45000
$\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.27500
H_3BO_3	0.08150
NaF	0.06350
$\text{NiCO}_3 \cdot 2\text{Ni}(\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.03180
LiCl	0.01740
NaVO_3	0.00690
グラニュー糖	221.02570

3-5. 結果

(1) ペプシン消化によるヘム鉄の分解率

水溶性ヘム鉄をペプシンで 0.5、1.0、1.5、2.0h 人工消化した。電気泳動の結果を図 2 に示した。ペプシンの酵素反応で、いずれの消化時間でも水溶性ヘム鉄の分解が起こることを確認した。画像分析ソフト ImageJ を用いて、ヘム鉄のバンドを面積値として定量化し分解率を算出した (図 3) 。分解率はペプシン消化時間 0.5、1.0、1.5、2.0h で、47.9、51.6、54.6、57.4% となった。1.0~2.0h においては分解率の上昇が約 3% 程度にとどまり、大きな変化は見られなかった。そのため、ラットの結紮腸管への投与は 1.5h ペプシン消化を行った水溶性ヘム鉄溶液にすることとした。

(2) 動物実験

鉄欠乏ラット作成時の 3 週間の増体重 (g/day) 、飼料摂取量 (g/day) 及び飼料効率 (%) を表 3 に、解剖時の終体重、Hematocrit 値、Hemoglobin 値は表 4 に示した。各群の間に有意差は認められなかった。

(3) 鉄取り込み率

N、H、DH 群の十二指腸からの鉄取り込み率を図 4 に示した。H、DH 群は N 群に比べて有意に高くなった。しかし、H 群、DH 群の間には有意差が認められず、ペプシン消化による影響は認められなかった。

(4) 鉄投与が門脈血および動脈血に及ぼす影響

門脈及び、動脈血清中の SI は図 5 に示した。門脈血では、CN 群の 26.3 $\mu\text{g/dL}$ と CH 群の 26.5 $\mu\text{g/dL}$ に対して N 群では 24.4 $\mu\text{g/dL}$ となり、ヘミン投与による血清鉄の有意な上昇は認められなかった。一方、CN 群、CH 群、N 群に対して H、DH 群は 57.5、77.5 $\mu\text{g/dL}$ となり、水溶性ヘム鉄投与による血清鉄の有意な上昇が認められた。また、DH 群は H 群よりも血清鉄濃度が有意に高くなった。動脈血では、門脈血の時と同様に CN 群の 23.3 $\mu\text{g/dL}$ と CH 群の 25.5 $\mu\text{g/dL}$ に対して N 群では 24.0 $\mu\text{g/dL}$ となり、ヘミン投与による血清鉄の有意な上昇は認められなかった。一方、H 群は 40.4 $\mu\text{g/dL}$ となり CH 群に対して有意な差が認められなかったが、DH 群は 51.9 $\mu\text{g/dL}$ となり CH 群より血清鉄濃度が有意に上昇した。しかし、H 群と DH 群の間には有意な血清鉄濃度の差が認められなかった。

門脈及び、動脈血清中の TIBC は図 6 に示した。いずれの群の間にも有意差は認められず、投与液の違いによる影響は認められなかった。

門脈及び、動脈血清中の Tf saturation は図 7 に示した。門脈血では、CN 群の 3.0% と CH 群の 3.0% に対して N 群でも 3.0% となり、ヘミン投与による Tf 飽和度の有意な上昇は認められなかった。一方、CN 群、CH 群、N 群に対して H 群で 6.8%、DH 群で 8.8% となり、水溶性ヘム鉄投与による Tf 飽和度の有意な上昇が認められた。また、DH 群は H 群よりも Tf 飽和度が有意に高くなった。動脈血では、門脈血と同様に CN 群で 3.8%、CH 群で 2.9%、N 群では 3.7% となり、いずれの群の間にも有意差は見られなかったが、H 群で 6.4%、DH 群で 8.4% となり、CN、CH、N 群より有意に高い値となった。また、DH 群は H 群より有

意に高い値となった。門脈及び、動脈血清中のヘム濃度は図 8 に示した。

門脈、動脈血共に各群の間に有意差は認められなかった。

門脈血清中のビリルビン濃度は図 9 に示した。DH 群は N 群との比較において有意に高い値となったが、他の群との比較においては有意な差は認められなかった。

(5) HO-1 タンパク質発現

ヘム鉄の分解に関与する HO-1 タンパク質の発現量は図 10 に示した。各投与群の間には有意差が認められず、投与液の違いによる影響は見られなかった。

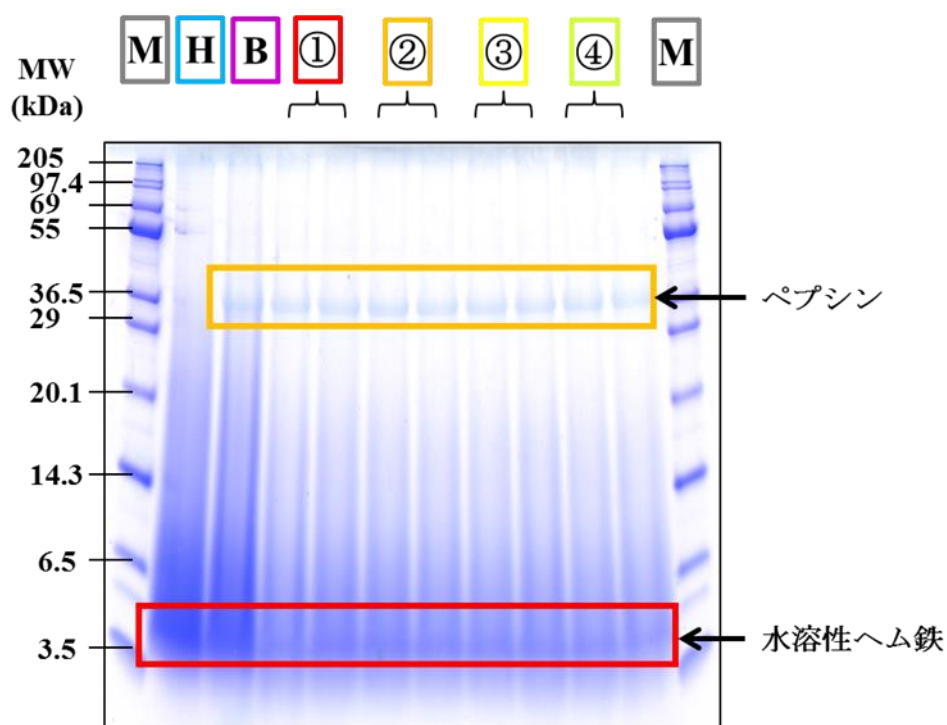


図 2. ペプシンによる水溶性ヘム鉄の分解

水溶性ヘム鉄をペプシンで 0.5、1.0、1.5、2.0 h 人工消化した後に電気泳動にかけ、CBB 染色を行った。各レーンのサンプルは以下の通りである。

}	M	Marker
	H	水溶性ヘム鉄 (酵素未処理)
	B	水溶性ヘム鉄 (酵素失活)
	①	水溶性ヘム鉄 (酵素処理, 0.5 h)
	②	水溶性ヘム鉄 (酵素処理, 1.0 h)
	③	水溶性ヘム鉄 (酵素処理, 1.5 h)
	④	水溶性ヘム鉄 (酵素処理, 2.0 h)

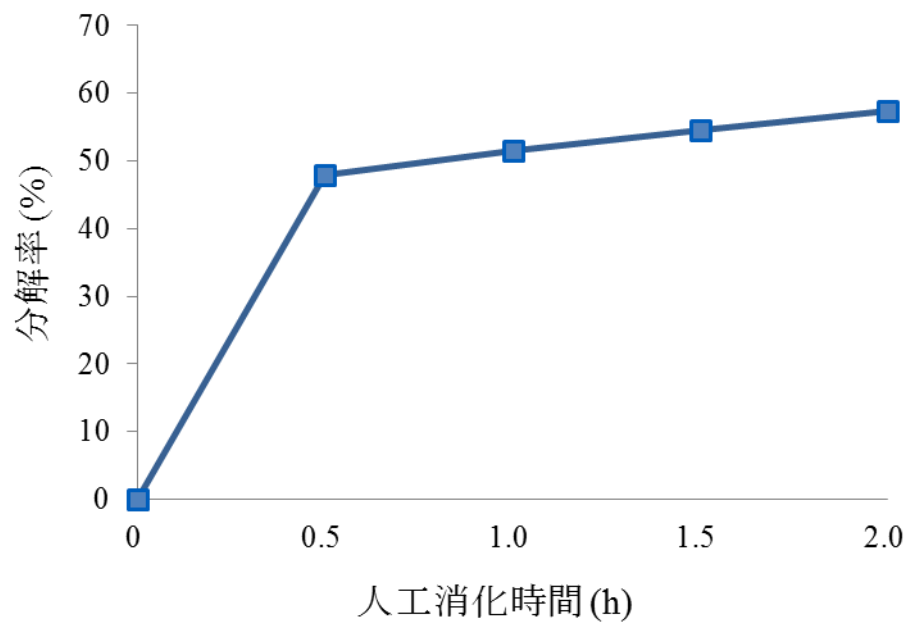


図 3. ペプシン消化時間における水溶性ヘム鉄の分解率

図 2 より、得られた水溶性ヘム鉄のバンドの濃度を面積値として定量化し、分解率を算出した。

表3. ラットの増体重、飼料摂取量、飼料効率

	4週齢				5週齢				6週齢			
	BWG (g/day)	FC (g/day)	FE (%)	BWG (g/day)	FC (g/day)	FE (%)	BWG (g/day)	FC (g/day)	BWG (g/day)	FC (g/day)	FE (%)	FE (%)
実験1 FeD (n=27)	6.7±0.7	13.2±0.8	51.5±2.8	6.8±0.6	15.6±0.9	43.9±2.9	6.2±0.4	16.2±0.7				37.4 ±2.8
Mean±S.D.												

BWG (Body Weight Gain) : 増体重 (g/day)

FC (Feed Consumption) : 摂取量 (g/day)

FE (Feed Efficiency) : 飼料効率 (%)

表4. 実験1における終体重、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度

実験1		BW (g)	Ht (%)	Hb (g/dL)
	CN群 (n=3)	235.4±33.4	19.9±5.3	7.58±0.55
	CH群 (n=3)	227.0±10.6	23.1±1.1	7.84±0.45
	N群 (n=7)	233.2±13.7	21.8±1.7	7.14±0.54
	H群 (n=7)	230.3±14.4	22.7±1.5	7.51±0.52
	DH群 (※n=6～7)	230.4±14.6	23.1±2.0	8.40±1.49

Mean±S.D.

BW (Body Weight): 終体重

Ht (Hematocrit): ヘマトクリット

Hb (Hemoglobin): ヘモグロビン

※BW (n=7) Ht, Hb (n=6)

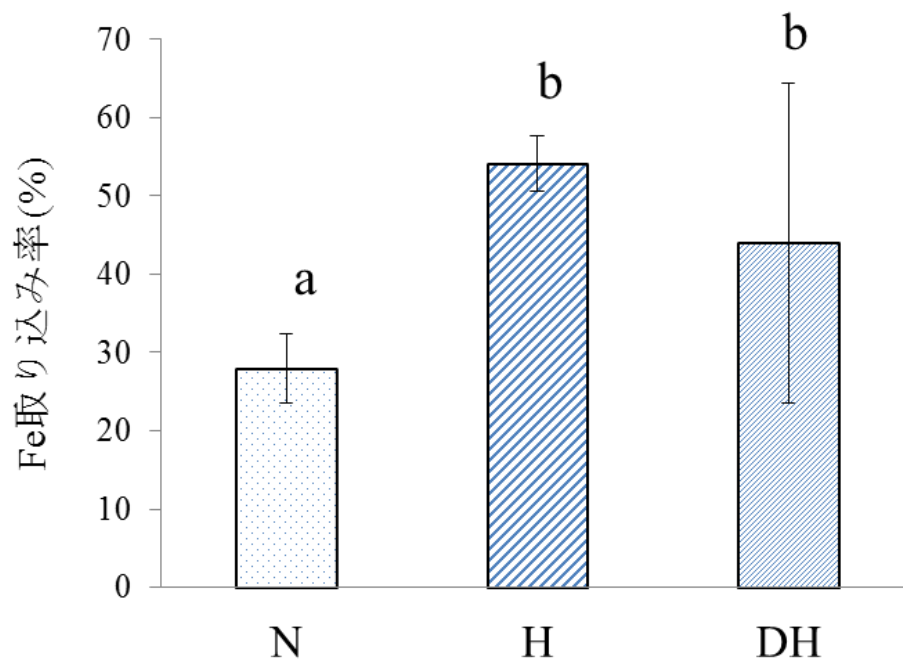


図 4. 各投与群における鉄取り込み率

結紮したラットの十二指腸にサンプルを投与し、15 分後に内容物を採取した。投与液および十二指腸内容物中の鉄濃度は原子吸光分析で測定し、その差から鉄取り込み率を算出した。

Mean±S.D., N, H, DH (n=5)

1 way-ANOVA, $P = 0.0032$, Bonferroni の最小有意差法

: 異なるアルファベット間に有意差あり ($p < 0.05$)

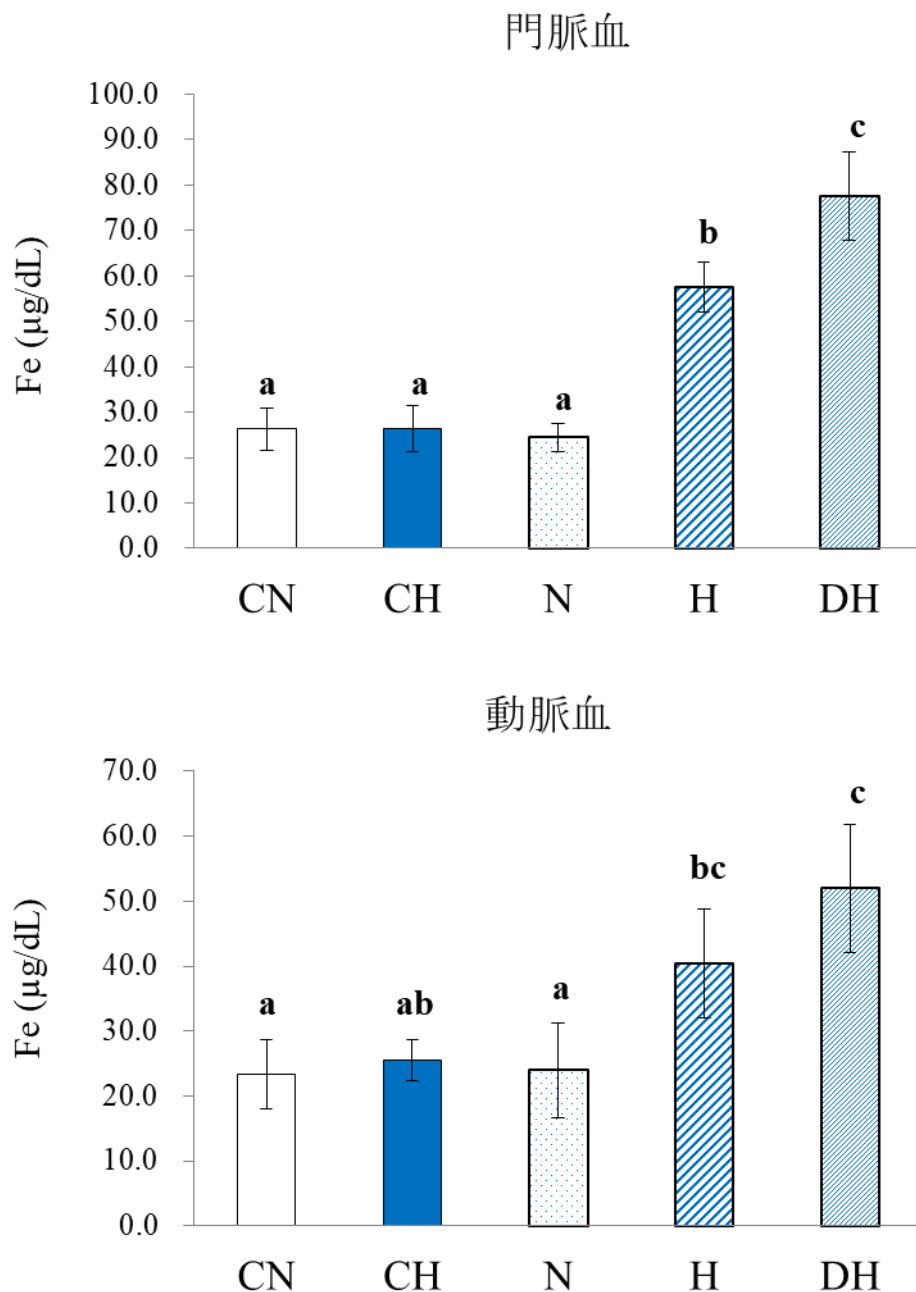


図 5. 各投与群における門脈及び動脈血清中の鉄濃度

ラットの十二指腸を結紮し、各サンプルを投与した。15 分後に門脈血と動脈血を採取し、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、得られた血清を用いた。測定は Nitroso-PSAP 法に基づくクイックオートネオ Fe (シノテスト株式会社, 東京都) を使用した。

Mean±S.D., CN, CH (n=2~3) ; N, H, DH (n=6~7)

門脈血 1way-ANOVA, P = 0.0000; 動脈血 1way-ANOVA, P = 0.0000 ;

Bonferroni の最小有意差法 :

異なるアルファベット間に有意差あり (門脈血, $p < 0.05$; 動脈血, $p < 0.05$)

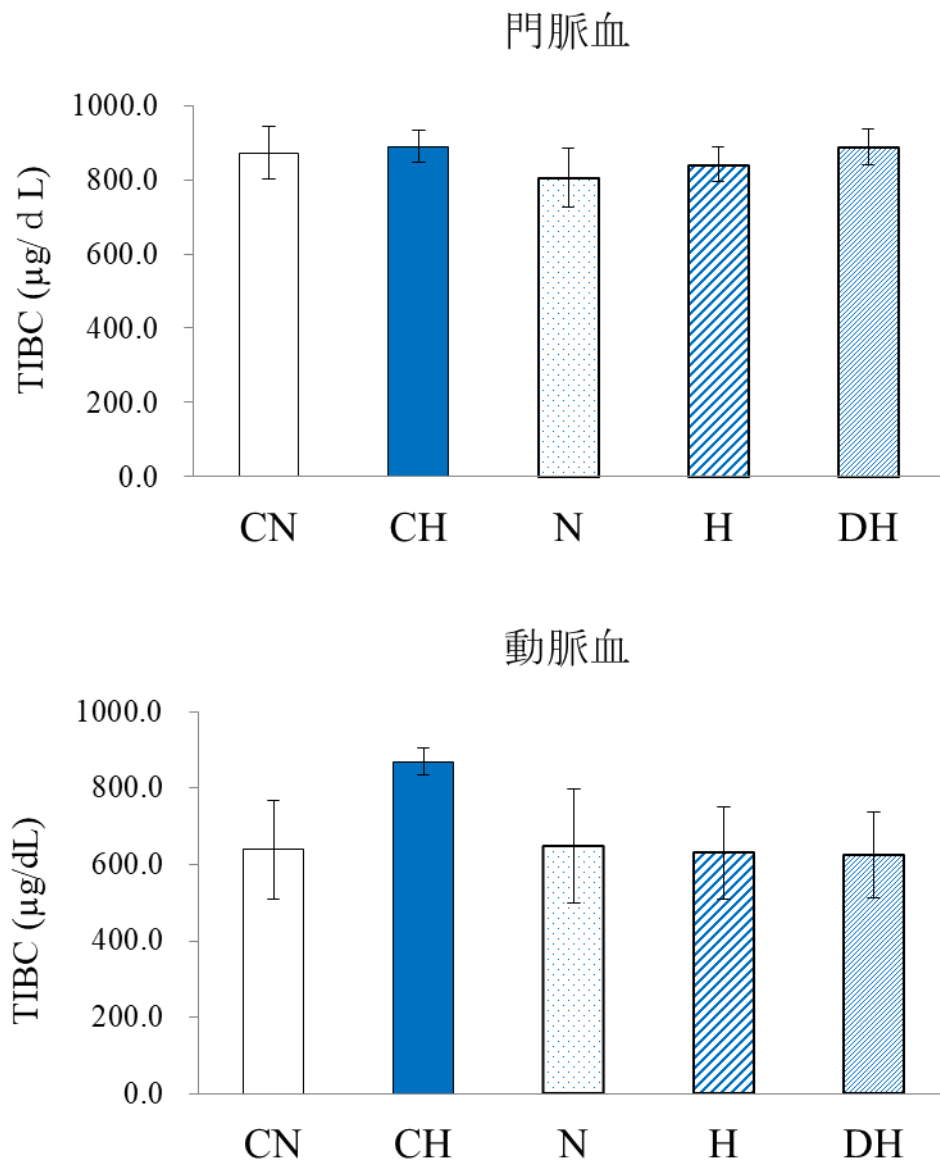


図 6. 各投与群における門脈及び動脈血清中の TIBC

ラットの十二指腸を結紮し、各サンプルを投与した。15 分後に門脈血と動脈血を採取し、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、得られた血清を用いた。TIBC は SI 値と UIBC 値の総和とした。

Mean±S.D., CN, CH (n=2~3) ; N, H, DH (n=6~7)

門脈血 1way-ANOVA, P =0.1278 ; 動脈血 1way-ANOVA, P =0.0817

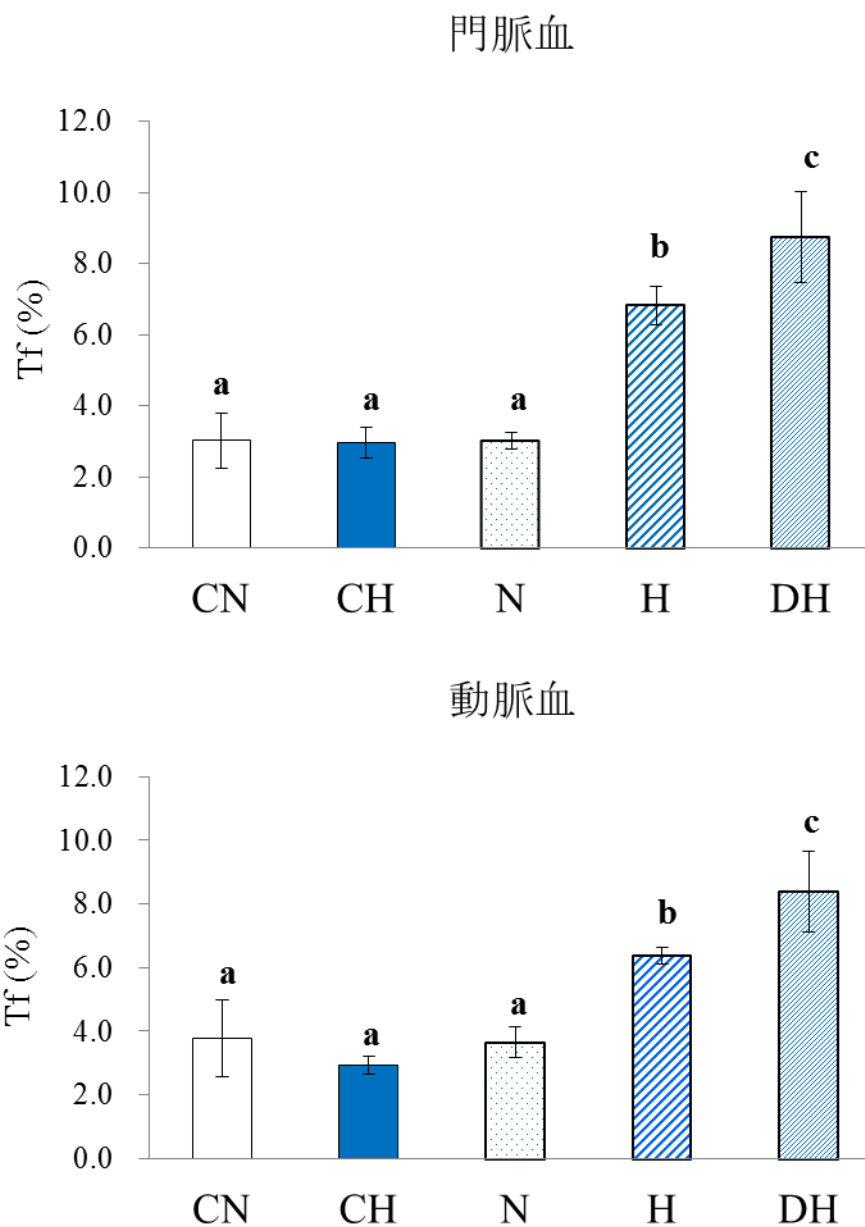


図 7. 各投与群における門脈及び動脈血清中の Tf saturation

ラットの十二指腸を結紮し、各サンプルを投与した。15 分後に門脈血と動脈血を採取し、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、得られた血清を用いた。

Tf 飽和度は、 $[(SI / TIBC) \times 100]$ から算出した。

Mean \pm S.D., CN, CH (n=2~3) ; N, H, DH (n=6~7)

門脈血 1way-ANOVA, P = 0.0000 ; 動脈血 1way-ANOVA, P = 0.0000 ;

Bonferroni の最小有意差法 : 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

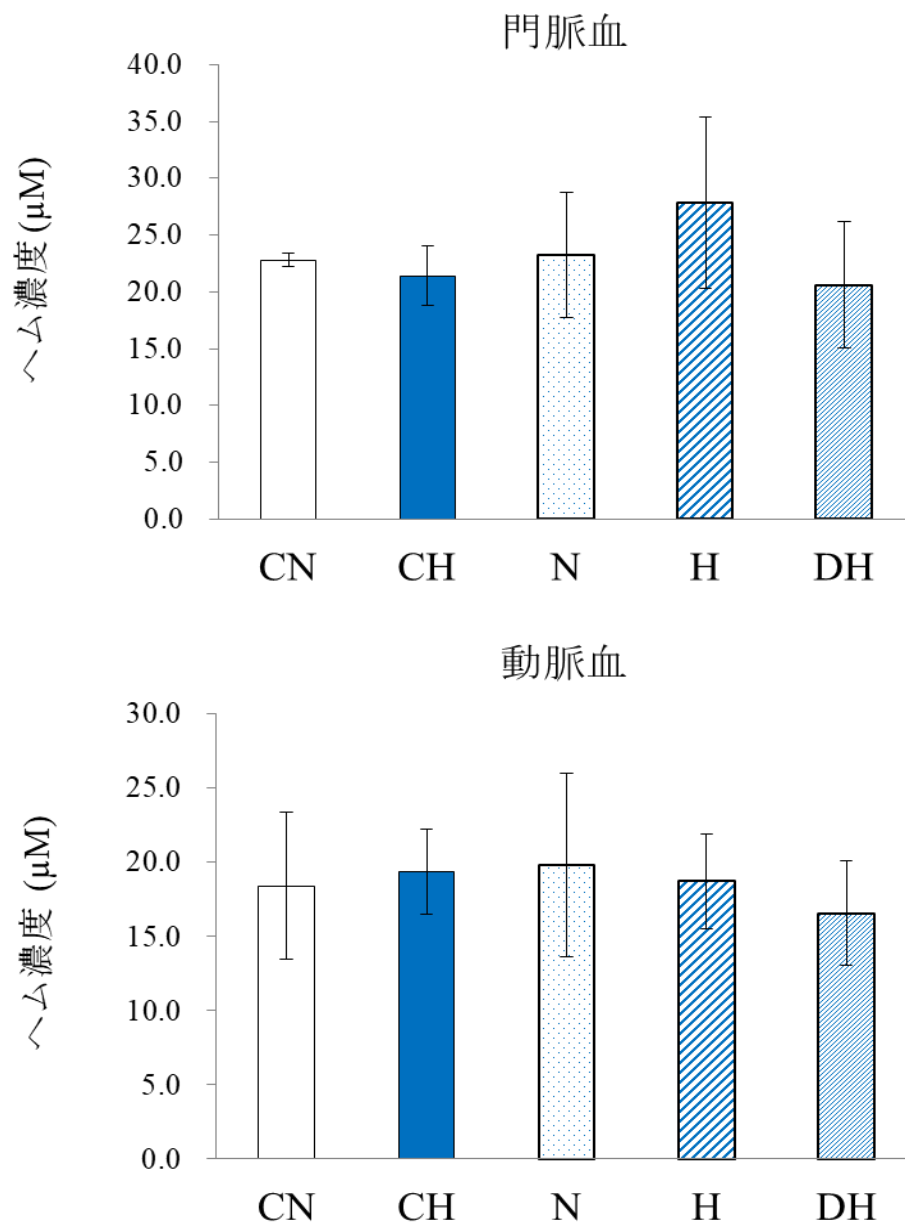


図 8. 各投与群における門脈及び動脈血清中のヘム濃度

ラットの十二指腸を結紮し、各サンプルを投与した。15 分後に門脈血と動脈血を採取し、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、得られた血清を用いた。

測定は QuantiChrom Heme Assay Kit (BAS) を使用した。

Mean±S.D., CN, CH (n=2~3) ; N, H, DH (n=5~7)

門脈血 1way-ANOVA, P = 0.2618;

動脈血 1way-ANOVA, P = 0.7958

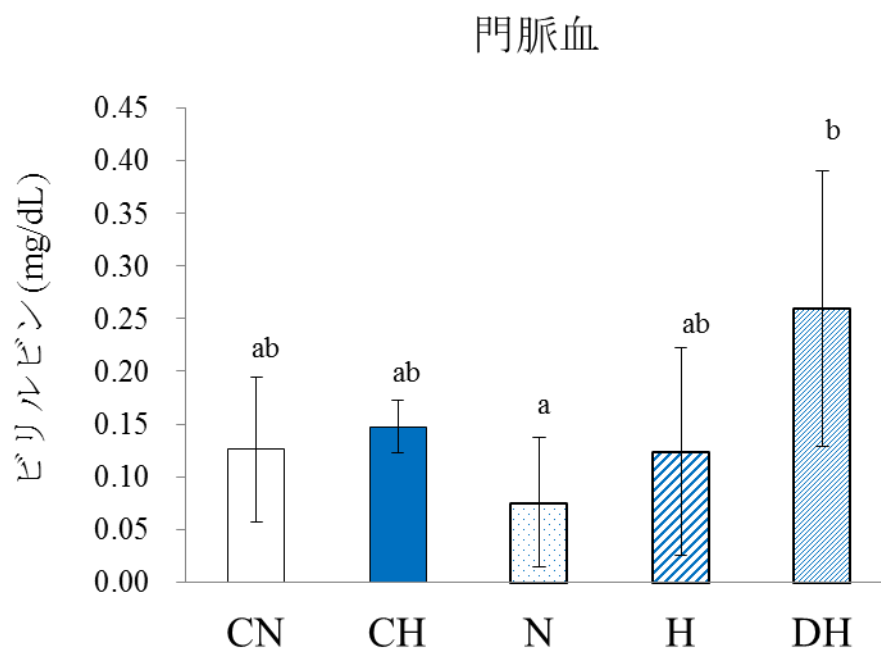


図 9. 各投与群における門脈血清中のビリルビン濃度

ラットの十二指腸を結紮し、各サンプルを投与した。15 分後に門脈血を採取し、3,000 rpm、15 分間遠心分離し、得られた血清を用いた。測定は QuantiChrom Bilirubin Assay Kit (BAS)を使用した。

Mean±S.D., CN, CH (n=3) ; N, H, DH (n=6~7)

1 way-ANOVA, P = 0.0260

Bonferroni の最小有意差法：異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

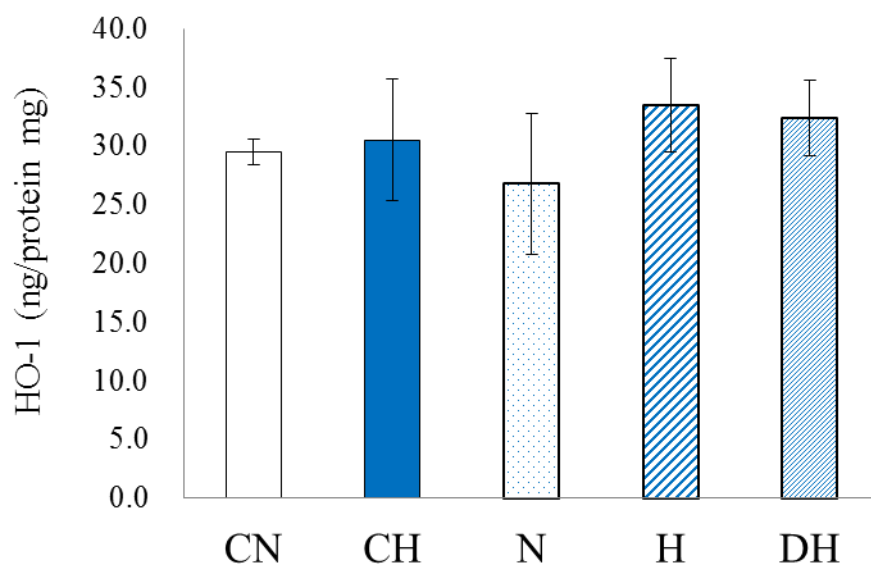


図 10. 各投与群における十二指腸の HO-1 発現量

各サンプルをラットの十二指腸に投与した後に粘膜細胞を採取し、ELISA 法により十二指腸粘膜細胞中の HO-1 タンパク質を定量した。

結果は protein 1mg あたりで示した。

Mean±S.D., CN, CH (n=3) ; N, H, DH (n=7)

1 way-ANOVA, P = 0.0826

3-6. 考察

本実験の目的は、消化管における消化が十二指腸からのヘム鉄の取り込み・輸送に影響を与えるか否かを明らかにすることである。実験 1 では、鉄欠乏ラットの十二指腸を結紮し、ヘミン、水溶性ヘム鉄、ペプシン消化水溶性ヘム鉄溶液を投与した N、H、DH 群、また、それぞれの鉄投与群に対する鉄無投与群として CN、CH 群を作成し、十二指腸へのヘム鉄の取り込みと血中への輸送を評価した。結果として、水溶性ヘム鉄はペプシンとパンクレアチンによる消化を受けることで、血中への鉄輸送が高められることが明らかとなった。

図 4 より、ラットの十二指腸からの鉄取り込み率は N 群に比べて H 群と DH 群で有意に高くなった。また、図 5 より、門脈血中の血清鉄濃度に関して H、DH 群では CN、CH、N 群より有意に高くなり、DH 群においては H 群よりも有意に高かった。今回の実験では、管腔内でのグロビン分解の影響を取り除くためにヘミンを投与し、グロビンやグロビン分解生成物が共存する水溶性ヘム鉄を投与した際の影響を比較した。先行研究ではウッシングチャンバーモデルを使用した実験において、ペプシンやサブチリシンの酵素反応によるヘモグロビン加水分解度の上昇が鉄取り込み率の上昇と関係していることが報告されている (Vaghefi *et al.*, 2000)。また、腸管からのヘモグロビン鉄の吸収において膵液と胆汁が及ぼす影響を調べた反転腸管実験では、消化酵素溶液の添加量の増加に伴い鉄吸収率も増加することが報告されている (田村ら, 1988)。その他にもアミノ酸による影響として、酵素で加水分解したヘモグロビンにシステインを添加することで、ラットの十二指腸粘膜を介した鉄取り込み率が有意に上昇することが報告されている (Vaghefi *et al.*, 2005)。そのため、管腔内におけるグロビンやグロ

ビンの分解生成物がヘム鉄の取り込み促進に関与している可能性がある。先行研究ではヘモグロビンの加水分解によって生成するペプチドやアミノ酸がヘム鉄の重合や不溶性となるのを防ぐことを報告している (Vaghefi *et al.*, 2000)。そのため、今回の動物実験では、ペプシンや膵液による水溶性ヘム鉄の消化が管腔内での水溶性ヘム鉄の溶解性を上昇させていた可能性があり、それには水溶性ヘム鉄由来の消化生成物が寄与していたことが示唆された。

一方、図 8 に示した門脈血清中のヘム濃度は門脈血中の血清鉄濃度の結果と異なり、各群間に有意差は認められなかった。また、図 10 より、ヘム鉄の分解に関与する HO-1 タンパク質の発現量は、各群の間に有意差は認められなかった。先行研究では、HO-1 は鉄欠乏時に十二指腸での活性が上昇すること (Raffin *et al.*, 1974; 篠田, 2012) や Caco-2 細胞を用いてヘム鉄の代謝を調べた実験では、細胞外のヘム鉄濃度が高くなるにつれて HO-1 活性も高くなることが報告されている (Le *et al.*, 2012)。これらのことから、今回の実験において粘膜細胞へと取り込まれた水溶性ヘム鉄は HO-1 で分解されて遊離鉄の形態となり、FPN1 を介して血中へと輸送されたと推察される。また、先行研究ではヘム鉄が粘膜細胞に取り込まれて、遊離の鉄として血中へ輸送される際に HO-1 が律速因子となることが示唆されている (村上ら, 1998)。そのため、今回の実験で門脈血中のヘム鉄濃度には有意差が認められないものの、血清鉄濃度が DH 群 > H 群となったことは、ペプシン消化による分解生成物が粘膜細胞内の HO-1 活性を賦活する可能性を示している。

4. 実験 2：ペプシンとパンクレアチン（膵液）による人工消化が

ヘム鉄の溶解性に及ぼす影響

4-1. 各 pH におけるヘム鉄の溶解性

3-2 と同様に 1.0 mM ヘミン溶液 (N 溶液)、1.0 mM 水溶性ヘム鉄溶液 (H 溶液)、1.0mM ペプシン消化水溶性ヘム鉄溶液 (DH 溶液) を調製した。各溶液は、HCl または NaOH を用いて pH1.0~11.0 に調整し、3,000×g、15 分で遠心分離した (In *et al.*, 2003)。得られた上清に 0.1N NaOH を加えることで、10~50 倍希釈とした。また、ヘム鉄標準液は QuantiChrom™ Heme Assay Kit (BioAssay Systems, USA) に付属する Calibrator (equivalent to 62.5 μ M heme) を使用した。Pandy らによるトリトン-メタノール発色法を参考に (Pandy *et al.*, 1999; 高橋と増田, 2009)、希釈したサンプルとヘム鉄標準液 20 μ L に 2.5% TritonX-100 を含むメタノール 180 μ L を添加し、Microplate Spectrophotometer (DYNEX TECHNOLOGIES, Spectra MR) を用いて吸光度を測定した。溶解率は 1.0 mM に対する上清中のヘム鉄濃度として算出した。(波長 405 nm)

4-2. ペプシンとパンクレアチン（膵液）消化によるヘム鉄分解生成物の定量

人工消化によるヘム鉄分解生成物の定量はトリニトロベンゼンスルホン酸吸光光度法 (TNBS 法) を用いて行った (阿部と井上, 2005; 神山ら, 2016; 米倉と中谷, 1989)。検量線は 500 μ M の L-glycine 溶液を倍々希釈することで、250、125、62.5、31.25、0 μ M に調整した。

3-2 と同様に 1.0 mM 水溶性ヘム鉄溶液 (H 溶液)、1.0 mM ペプシン消化

水溶性ヘム鉄溶液 (DH 溶液) を調製し、0.9 M NaHCO_3 で pH5.3 に調整した。各溶液 10 mL に 1.0M NaOH と基質に対して 4% となるようにパンクレアチン (Sigma-Aldrich, USA) 溶液 (4.334 mg/mL) を 500 μL 添加し、pH6.0、6.5、7.0 に調整した。パンクレアチンによる人工消化は 37°C, 0、15、30、60 分で行い、100°C, 10 分で反応を停止した (Jegasothy *et al.*, 2014)。続いて、試料 500 μL に 30% TCA (トリクロロ酢酸) を 100 μL 加え、16,000 $\times g$, 5 分、4°C で遠心分離することで除タンパク質処理を行った。得られた上清は 0.1M ほう酸緩衝液 (pH 9.5) を用いて、H 溶液で 20 倍希釈、DH 溶液で 50 倍希釈した。希釈した試料 40 μL をプレートに分注し、0.1 M ほう酸緩衝液 (pH 9.5) 160 μL と TNBS 溶液 (亜硫酸ナトリウム 31.5 mg と TNBS 25 mg を超純水 50 mL に溶解したもの) 80 μL を加えた。遮光条件下で 37°C, 1 時間反応させた後、Microplate Spectrophotometer (DYNEX TECHNOLOGIES, Spectra MR) を用いて吸光度を測定した。(波長 450 nm)

4-3. ペプシンとパンクレアチン (膵液) 消化によるヘム鉄の溶解性

4-2 でパンクレアチン消化を行った H、DH 溶液を 3,000 $\times g$ 、15 分で遠心分離し、得られた上清に 0.1N NaOH を加えることで 5~10 倍希釈とした。希釈したサンプルとヘム鉄標準液 20 μL に 2.5% TritonX-100 を含むメタノール 180 μL を添加し、Microplate Spectrophotometer (DYNEX TECHNOLOGIES, Spectra MR) を用いて吸光度を測定した。溶解率は 1.0 mM に対する上清中のヘム鉄濃度として算出した。(波長 405 nm)

4-4. 結果

(1) 各 pH におけるヘム鉄の溶解性

各 pH におけるヘム鉄の溶解性を図 11 に示した。N 溶液は pH8.0～11.0 において、溶解率が 93.6～100% となった。しかし、pH 1.0 から 7.0 の間において、N 溶液で 29.4 % 以下、H 溶液で 28.9 % 以下、DH 溶液で 30.2 % 以下となった。また、pH8.0 から 11.0 にかけて H 溶液は 37.1 % から 51.5 %、DH 溶液は 48.5 % から 75.1 % へと上昇し、アルカリ性になるにつれて溶解率が高くなることが分かった。

(2) ペプシンとパンクレアチン（膵液）消化による水溶性ヘム鉄

分解生成物の定量

ペプシンとパンクレアチン消化による水溶性ヘム鉄の分解生成物濃度は図 12 に示した。H 溶液においてはパンクレアチン反応時間 0min で 1.6～1.7 mM、15min で 2.6～2.8 mM、30min で 3.0～3.4 mM、60min で 3.4～4.1 mM となった。一方、DH 溶液においてはパンクレアチン反応時間 0min で 11.6～12.0 mM、15min で 13.3～13.8 mM、30min で 14.5 mM、60min で 15.4～16.2 mM となり、H・DH 溶液共に pH 変化による大きな影響は見られなかった。また、パンクレアチン反応 60 分間における分解生成物濃度は H 溶液で約 2.23 mmol/mL、DH 溶液で約 3.87 mmol/mL 増加した。

(3) ペプシンとパンクレアチン（膵液）消化が水溶性ヘム鉄の溶解性に及ぼす影響

ペプシンとパンクレアチン消化による水溶性ヘム鉄の溶解率は図 13 に示した。パンクレアチン反応時間 0 から 60min における H 溶液の溶解率は pH6.0 で 13.7 から 22.3 %、pH6.5 で 24.6 から 31.5 %、pH7.0 で 30.0 から 36.9 %に増加した。DH 溶液の溶解率は pH6.0 で 3.8 から 4.0 %、pH6.5 で 14.3 から 15.2 %、pH7.0 で 23.5 から 25.1 %に増加した。しかし、DH 溶液の溶解率は H 溶液の溶解率より低くなった。

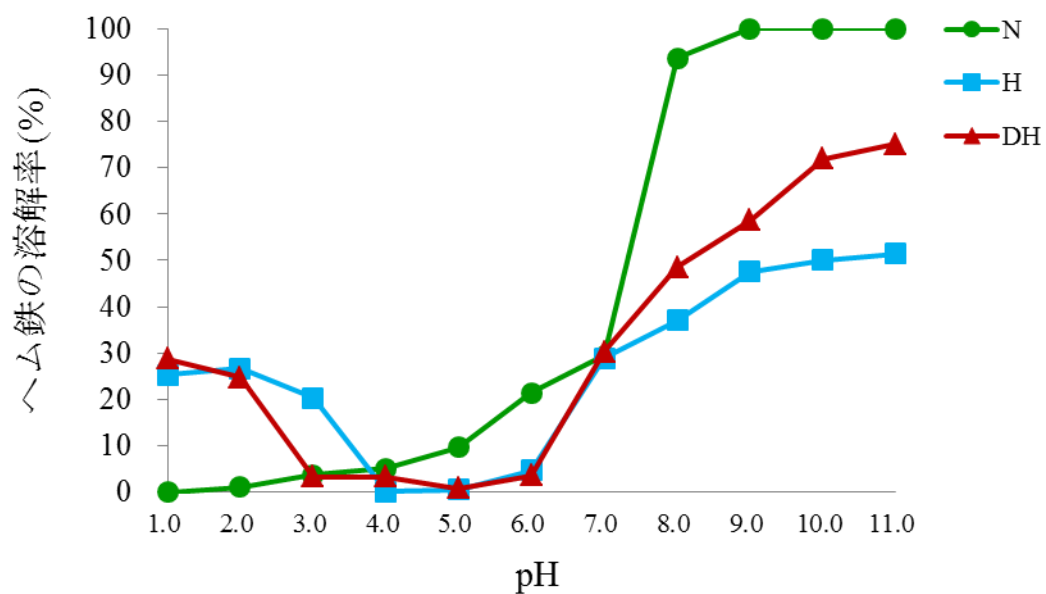


図 11. 各 pH におけるへム鉄の溶解率

3-2 と同様に 1.0 mM ヘミン溶液 (N)、1.0 mM 水溶性へム鉄溶液 (H)、1.0 mM ペプシン消化水溶性へム鉄溶液 (DH) を作成した。各サンプルは HCl または NaOH を用いて pH 1.0 ~ 11.0 に調整し、溶解しているへム濃度から溶解率を算出した。

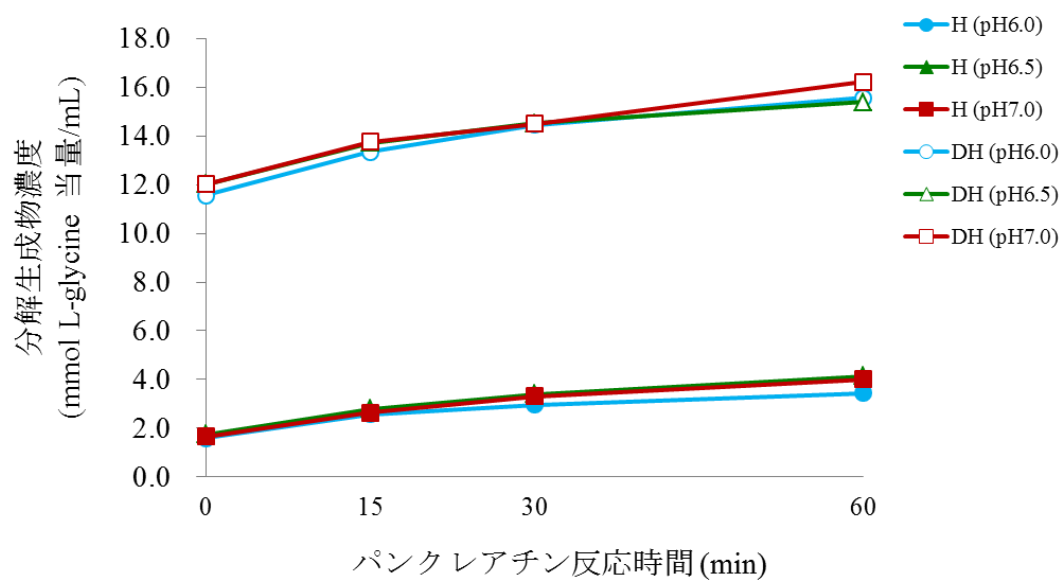


図 12. パンクレアチン反応時間における水溶性ヘム鉄の分解生成物濃度

3-2 と同様に 1.0 mM 水溶性ヘム鉄溶液 (H) 、1.0 mM ペプシン消化水溶性ヘム鉄溶液 (DH) を作成した。各サンプルはパンクレアチン溶液添加時に pH6.0、6.5、7.0 となるように調整し、0、15、30、60min 反応させた。

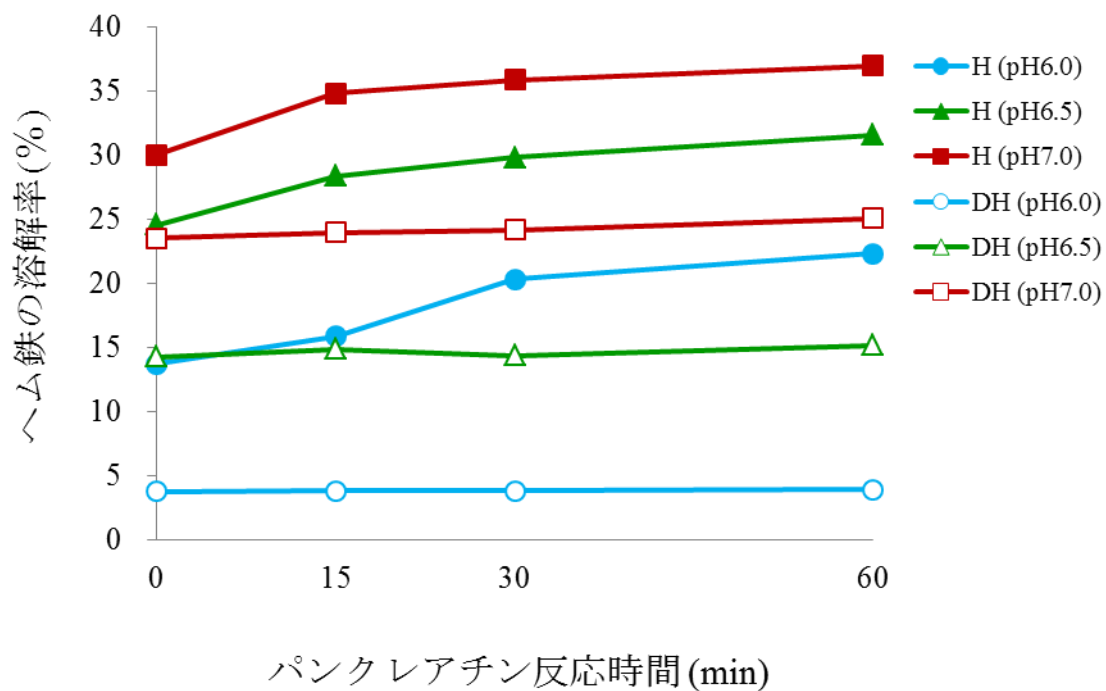


図 13. パンクレアチン反応時間における水溶性ヘム鉄の溶解率

3-2 と同様に 1.0 mM 水溶性ヘム鉄溶液 (H) 、1.0 mM ペプシン消化水溶性ヘム鉄溶液 (DH) を作成した。各サンプルはパンクレアチン溶液添加時に pH6.0、6.5、7.0 となるように調整し、0、15、30、60min 反応させた。溶解率は 4-1 と同様の方法で算出した。

4-5. 考察

実験 1 の結果より、十二指腸からのヘム鉄の取り込み・輸送にはペプシンや膵液による水溶性ヘム鉄の消化が関与している可能性が示唆された。水溶性ヘム鉄由来の消化生成物が水溶性ヘム鉄の溶解性を上昇させること、ヘム鉄のポルフィリン環にペプチドが結合していることが粘膜細胞内への取り込みに必要であること、また、消化で生成されたペプチドやアミノ酸が取り込みや輸送を促進することなどが考えられた。そこで、実験 2 ではペプシンやパンクレアチン消化による分解生成物の増加が水溶性ヘム鉄の溶解性に影響を及ぼすか否かを調べた。また、これに先立ち pH が水溶性ヘム鉄の溶解性に及ぼす影響を考慮するため、各 pH におけるヘム鉄の溶解率も調べた。結果として、ペプシン消化により水溶性ヘム鉄の溶解性は低下するが、それと同時にパンクレアチンによる消化を受け易くなることが明らかとなった。

図 11 より、pH 1.0～11.0 におけるヘム鉄の溶解率は pH 2.0 から 7.0 の間において、N 溶液で 29.4 % 以下、H 溶液で 28.9 % 以下、DH 溶液で 30.2 % 以下となり、胃から十二指腸管腔内での pH では溶解性が低くなった。また、pH 8.0 から pH 11.0 になるにつれて溶解率が高くなることが明らかとなった。先行研究においても使用しているヘム鉄や鉄含有率は不明だが、酸性条件下で溶解率が低く、アルカリ条件下で溶解率が高くなることが報告されている (In *et al.*, 2003)。そのため、生体内でも十二指腸から下部へと pH が上がるにつれて、水溶性のヘム鉄の溶解性が高くなる可能性が考えられる。

図 12 より、パンクレアチン消化による分解生成物濃度は、反応時間 0min において H 溶液より DH 溶液で高く、いずれの溶液も反応時間の経過と共に

に増加した。しかし、ペプシンによる消化ほど分解物は生成されなかった。

また、パンクレアチン反応 60 分間における分解生成物濃度の増加は、H 溶液より DH 溶液で高くなった。これらの結果から、ペプシンで消化を受けた水溶性ヘム鉄は、パンクレアチンによる消化を受け易くなることが明らかとなった。先行研究ではグロビンの人工消化において、ペプシンの方がパンクレアチンより消化性が高いことを示しており、その要因の一つとしてペプシンの基質特異性が低いことを挙げている (米倉ら, 1990) 。そのため、今回の実験条件ではペプシンによる消化を受けた水溶性ヘム鉄溶液の方が加水分解物を多く含んでいたと言える。しかし、図 13 より、各 pH における H 溶液と DH 溶液の溶解率を比較すると、いずれの pH においても DH 溶液の方が H 溶液より溶解率が低くなった。また、パンクレアチン消化によって H 溶液では溶解率が数%上昇するが、DH 溶液では溶解率の変化が見られなかった。これらの結果から、パンクレアチン消化は水溶性ヘム鉄の溶解性の上昇にわずかに寄与するが、ペプシン消化は水溶性ヘム鉄の溶解率を低下させることが明らかとなった。先行研究ではヘム鉄の加水分解度を上げるにつれて、溶解性が低下することを示している (In *et al.*, 2003) 。また、ペプシンによるヘム鉄の加水分解にはヘム鉄の重合を防ぐ作用が見られず、ある一定の分解率を超えると急激にヘム鉄の重合が起きることも報告されている (Vaghefi *et al.*, 2000) 。そのため、今回の実験におけるヘム鉄の溶解率の低下は、ペプシン消化によるヘム鉄の重合が原因であった可能性が推察される。また、図 12 より、ペプシン消化はパンクレアチン消化と比較して分解生成物濃度が高いことから、水溶性ヘム鉄に結合するグロビンが減少し、疎水性であるポルフィリン環が表面に露出してくることが考えられる。そして、そのことが原因で水溶性ヘム鉄の溶解率が

低下した可能性もある。

5. 総合考察

ヘム鉄の吸収が非ヘム鉄より優れていることは広く知られている。しかし、ヘム鉄の吸収経路は明らかでなく、ヘム鉄の吸収は期待するほど高くないという結果も多く存在する。そのため、ヘム鉄の吸収率の評価に関しては、消化や共存物質の影響など解決すべき様々な課題が存在する。本研究の目的は、消化管におけるヘム鉄の消化が十二指腸でのヘム鉄吸収に影響を与えるか否か明らかにすることである。実験 1 ではペプシンによる人工消化や十二指腸管腔内でパンクレアチンによって生成した共存物質がヘム鉄の吸収に及ぼす影響を調べた。ヘム鉄の酵素分解によって生成するペプチドやアミノ酸は不溶性のヘム重合体の形成を防ぐことで溶解性を保ち、鉄の取り込みを助けるとされている。そこで、実験 2 ではペプシンやパンクレアチンによる消化がヘムの溶解性に及ぼす影響を検討した。

実験 1 では消化管における消化が十二指腸からのヘム鉄の取り込み・輸送に影響を与えるか否かを明らかにするために、ヘミン、水溶性ヘム鉄、ペプシン消化水溶性ヘム鉄溶液を投与し、十二指腸粘膜へのヘム鉄の取り込みと血中への鉄の輸送を評価した。その結果、水溶性ヘム鉄とペプシン消化水溶性ヘム鉄はヘミンと比較して十二指腸管腔から粘膜細胞内への鉄取り込み及び門脈中の血清鉄濃度が有意に高くなり、血清鉄に関してはペプシン消化を行った水溶性ヘム鉄の方が有意に高くなった。しかし、門脈血中の血清ヘム濃度は各群間に有意差は認められなかった。また、ヘム鉄の分解に関与する HO-1 タンパク質の発現量は、各群の間に有意差は認められなかった。これらのことから、管腔内におけるグロビンやグロビンの分解生成物が十二指腸からのヘム鉄の取り込み・輸送に関与していること

や取り込まれた水溶性ヘム鉄が HO-1 で分解されて遊離鉄の形態として血中へと輸送される可能性が考えられる。そこで、水溶性ヘム鉄の消化生成物が管腔内での水溶性ヘム鉄の溶解性を上昇させると推察し、実験 2 ではペプシンやパンクレアチン消化による分解生成物の増加と水溶性ヘム鉄の溶解性の関係を調べた。その結果、パンクレアチンよりもペプシンで消化した水溶性ヘム鉄の方が多くの分解物を生成することが分かった。しかし、パンクレアチン消化は水溶性ヘム鉄の溶解性の上昇にわずかに寄与するが、ペプシン消化は水溶性ヘム鉄の溶解性を低下させることが明らかとなった。

実験 1 と 2 の結果を踏まえると、ペプシン消化による溶解性の低下は十二指腸からのヘム鉄の取り込み・輸送と関係性が無いと考えられる。しかし、実験 1 の結果からペプシン消化は十二指腸粘膜細胞へ取り込みではなく、門脈血への輸送の際に影響を及ぼすことは明らかである。消化によって生成されたペプチドやアミノ酸が粘膜細胞に取り込まれることは確認していないが、おそらく粘膜細胞内の HO-1 を活性化させる可能性が有る。そして、取り込まれたヘム鉄を速やかに遊離鉄に分解することで、門脈血中への輸送を促進することが推察される。この仮説を立証するためには、水溶性ヘム鉄の消化生成物をヘミン溶液と共にラットの十二指腸に投与し、十二指腸からの取り込み・輸送に及ぼす影響を評価する必要がある。

ヘム鉄の吸収経路は未だ明らかにされていないが、消化が鉄の取り込みや輸送に与える影響のメカニズムを解明することで、吸収率の高いヘム鉄の精製へと応用され、鉄欠乏性貧血の治療や予防に活かされることを期待したい。

6. 謝辞

本論文の作成にあたり、数多くの方々からご援助を賜りました。栄養生化学研究室の篠田粧子教授には研究に取り組む姿勢や論文の書き方など、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました。心より御礼申し上げます。適応科学分野の北一郎教授及び、公衆栄養学研究室の稲山准教授には異なる分野の視点から貴重な多くの御指摘と助言を賜りました。誠にありがとうございました。

また、本研究を遂行するにあたり、多大な御協力と御意見をいただきました有田安那さん、陳風霞さん、東雄貴さん、小泉真緩さん、Wu Jia Wei 君、先生方及び院生の皆様にも深く感謝いたしております。

最後に、論文執筆のために常に支えていただいた方々に感謝の意を込めて、謝辞といたします。

7. 引用文献

阿部茂, 井上貞仁, 2005, 乳廃牛を用いた新規乾燥食肉製品の開発. *北海道立食品加工研究センター研究報告= Bulletin of Hokkaido Food Processing Research Center*, **6**, 1-5

東雄貴, 2016, ラット小腸におけるヘム鉄の吸収部位及び輸送形態に関する研究 平成 28 年度首都大学東京修士学位論文

Björn-Rasmussen, E., Hallberg, L., Isaksson, B., Arvidsson, B., 1974, Food Iron Absorption in Man APPLICATIONS OF THE TWO-POOL EXTRINSIC TAG METHOD TO MEASURE HEME AND NONHEME IRON ABSORPTION FROM THE WHOLE DIET, *J. CLIN. INVEST.*, **53**(1), 247-255

Centers for Disease Control and Prevention (CDC)., 2002, Iron deficiency--United States, 1999-2000, *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, **51**(40), 897

De Andrade Cairo, R. C., Rodrigues Silva, L., Carneiro Bustani, N., Ferreira Marques, C. D., 2014, Iron deficiency anemia in adolescents; a literature review, *Nutr. Hosp.*, **29**(6), 1240-9

Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Hediger, M. A., 1997, Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.*, **388**(6641), 482-488

Jegasothy, H., Weerakkody, R., Selby-Pham, S., and Bennett, L. E., 2014, In vitro heme and non-heme iron capture from hemoglobin, myoglobin and ferritin by bovine lactoferrin and implications for suppression of reactive oxygen species in vivo, *Biometals.*, **27**(6), 1371-1382

神山伸, 櫛原詩野, 須崎奈美, 田山舞, 本間千裕, 瀧口真子, 曾根英行, 2016, 米粉と小麦粉の雪室貯蔵が品質に与える影響, *人間生活学研究*, (7), 75-84

Ko, C., Siddaiah, N., Berger, J., Gish, R., Brandhagen, D., Sterling, R. K., Cotler, S. J., Fontana, R. J., McCashland, T. M., Han, S. H., Gordon, F. D., Schilsky, M. L., Kowdley, K. V., 2007, Prevalence of hepatic iron overload and association with hepatocellular cancer in end-stage liver disease: results from the National Hemochromatosis Transplant Registry., *Liver. Int.*, **27**(10), 1394-401

Hayashi, F., Yoshiike, N., Yoshita, K., 2007, Trends in the prevalence of anaemia in Japanese adult women, 1989–2003, *Public. Health. Nutrition.*, **11**(3), 252–257

金沢治子, 岩崎礼子, 1991, 現代の女子学生の食生活の実態 (第 3 報): 肥満度別にみた健康状態および食行動, 横浜女子短期大学, *研究紀要*, **7**, 95-107

樋口満, 1995, 競技力向上における栄養の役割, *日本食生活学会誌*, **6**(2), 38-43

小阪昌明, 2012, わが国における鉄欠乏, 鉄欠乏性貧血女性の増加と栄養. *四国医学雑誌*, **68**(1), 13-18

小林ゆき子, 木戸康博, 中坊幸弘, 2007, 鉄欠乏性貧血ラットの回復期における食事たんぱく質およびペプチドの影響, *栄養学雑誌*, **65**(4), 165-171

古俣智江, 2006, 鉄欠乏性貧血の栄養管理について, 国際学院埼玉短期大学, *研究紀要*, **27**, 63-70

五十嵐香織, 中村寛子, 中西由季子, 中台忠信, 岡安誠, 蛭沼利江子, 木村修一, 2004, ラットにおける各種鉄強化剤による鉄欠乏改善に対する効果の比較, *日本栄養・食糧学会誌*, **57**(2), 89-97

In, M. J., Kim, D. C., Chae, H. J., & OH, N. S., 2003, Effects of degree of hydrolysis and pH on the solubility of heme-iron enriched peptide in hemoglobin hydrolysate, *BIOSCI. BIOTECH. BIOCH.*, **67**(2), 365-367

Inoue, K., Nakai, Y., Ueda, S., Kamigaso, S., Ohta, K. Y., Hatakeyama, M., Yuasa, H., 2008, Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model, *AM. J. PHYSIOL-GASTR L.*, **294**(3), G660-G668

Laftah, A. H., Latunde-Dada, G. O., Fakhri, S., Hider, R. C., Simpson, R. J., McKie, A. T., 2009, Haem and folate transport by proton-coupled folate transporter/haem carrier protein 1 (SLC46A1), *BRIT. J. NUTR.*, **101**(08), 1150-1156

Layrisse, M., Martánez-Torres, C., Cook, J. D., Walker, R., Finch, C. A., 1973, Iron fortification of food: its measurement by the extrinsic tag method. *Blood.*, **41**(3), 333-352.

Le Blanc, S., Garrick, M. D., Arredondo, M., 2012, Heme carrier protein 1 transports heme and is involved in heme-Fe metabolism, *AM. J. PHYSIOL-CELL. PH.*, **302**(12), C1780-C1785

村上亜由美, 内田三香子, 松浦寿喜, 市川富夫, 1997, 雌ラットにおける酵素処理ヘム鉄とクエン酸鉄の鉄利用性の差違, *日本栄養・食糧学会誌*, **50**(1), 31-36

村上亜由美, 岸本三香子, 川口真規子, 松浦寿喜, 市川富夫, 1998, 雌ラットにおける酵素処理ヘム鉄の生体利用性に及ぼす因子について, *武庫川女子大学紀要 自然科学編*, **45**, 113-118.

Mursu, J., Robien, K., Harnack, L.J., Park, K., Jacobs, D.R., Jr., 2011, Dietary Supplements and Mortality Rate in Older Women : The Iowa Women's Health Study, *ARCH. INTERN. MED.*, **171**(18), 1625-1633

Nakamori, M., Hien, V. T. T., Khan, N. C., Lam, N. T., Dung, N. T., Uotsu, N., YAMAMOTO, S., 2010, Diffructose anhydride III enhances bioavailability of water-insoluble iron in anemic Vietnamese women, *J. NUTR. SCI. VITAMINOL.*, **56**(3), 191-197

Pandey, A. V., Joshi, S. K., Tekwani, B. L., & Chauhan, V. S., 1999, A colorimetric assay for heme in biological samples using 96-well plates, *ANAL. BIOCHEM.*, **268**(1), 159-161

Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C.L., Sassa, S., Wood, B. L., Abkowitz, J. L., 2004, Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis, *Cell*, **118**(6), 757-766

Raffin, S. B., Woo, C. H., Roost, K. T., Price, D. C., Schmid, R., 1974, Intestinal Absorption of Hemoglobin Iron-Heme Cleavage by Mucosal Heme Oxygenase, *J. CLIN. INVEST.*, **54**(6), 1344-1352

関口伸子, 藤村理佳, 村田容常, 本間清一, 1992, インスタントコーヒー中の鉄結合性物質の検索, *日本農芸化学会誌*, **66**(4), 689-698

Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Frazer, D. M., 2005, Identification of an intestinal heme transporter, *Cell.*, **122**(5), 789-801

Shinoda, S., Yoshizawa, S., Nozaki, E., Tadai, K., Arita, A., 2014, Marginally excessive iron loading transiently blocks mucosal iron uptake in iron-deficient rats, *AM. J PHYSIOL-GASTR. L.*, **307**(1), G89-G97.

篠田卓弥, 2012, 小腸粘膜細胞におけるヘム鉄の吸収に関する研究 平成24年度首都大学東京修士学位論文

高橋重一, 増田建, 2009, ヘムの分析, *低温科学= Low Temperature Science*, **67**, 327-337

田村幸永, 松村伸康, 清水俊雄, 1988, 鉄の腸管吸収測定法およびヘム鉄の吸収測定, *日本栄養・食糧学会誌*, **41**(6), 490-495

宇野久光, 山口弓子, 松本能里, 2009, 若年女性及び女子大学生の貧血の検討, *日本赤十字広島看護大学紀要*, **9**, 31-37.

Vaghefi, N., Guillochon, D., Bureau, F., Jauzac, P., Neuville, D., Jacob, B., and Bouglé, D, 1998, Effect of stabilising amino acids on the digestive absorption of heme and non-heme iron, *REPROD. NUTR. DEV.*, **38**(5), 559-566

Vaghefi, N., Nedjaoum, F., Guillochon, D., Bureau, F., Arhan, P., and Bouglé, D., 2000, Influence of the extent of haemoglobin hydrolysis on the digestive absorption of haem iron in the rat. An in vitro study, *EXP. PHYSIOL.*, **85**(4), 379-385

Vaghefi, N., Nedjaoum, F., Guillochon, D., Bureau, F., Arhan, P., and Bouglé, D., 2005, Iron absorption from concentrated hemoglobin hydrolysate by rat, *J. NUTR. BIOCHEM.*, **16**(6), 347-352

Villarroel, P., Flores, S., Pizarro, F., de Romaña, D. L., and Arredondo, M., 2011, Effect of dietary protein on heme iron uptake by Caco-2 cells, *EUR. J. NUTR.*, **50**(8), 637-643.

渡辺晃伸, 1968, タンニン酸 (喫茶) の鉄吸収に及ぼす影響について, *内科*, **21**(1), 149-152

WHO, 1968, Nutritional anaemias: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 13 to 17 March 1967]

WHO., 2014, Methodological approaches to estimating global and regional prevalences of vitamin and mineral deficiencies,
<http://www.who.int/vmnis/anaemia/en/>

山根靖弘, 1990, 生体中の微量元素の役割, *保健物理*, **25**, 269-277

米倉政実, 中谷哲郎, 1989, Achromobactre Protease I を利用する小麦グルテンの栄養機能の改善 第 3 報 小麦グルテン修飾物の消化性, *茨城大学農学部学術報告*, **37**, 85-94

米倉政実, 宮口右二, 堤将和, 中谷哲郎, 1990, ブタ血液グロビンの消化性に及ぼすサクシニル化の影響, 茨城大学農学部学術報告, **38**, 127-135.

Zimmermann, M. B., Hurrell, R. F., 2007, Nutritional iron deficiency, *Lancet.*, **370**, 511-520